

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

P/DE 99 / 02816



16/3 185

REC'D	08 DEC 1999
WIPO	PCT

Bescheinigung

DE 99 / 2816

Die Anmelderin Privates Institut Bioserv GmbH in Rostock/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen humane Elastase 1 und deren Nutzung in Nachweissystemen"

am 8. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. November 1999
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 40 900.1

Weihmayr



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

00100998

3

Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen humane Elastase 1 und deren Nutzung in Nachweissystemen

H.-W. Heinrich, H.-J. Wagner, R. Kleinert, U. Meyer

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen humane Elastase 1 beschrieben. Das Ziel wird erfindungsgemäß durch die Verwendung synthetischer Peptide mit den Aminosäuresequenzen

1. $\text{NH}_2\text{-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH}$
2. $\text{NH}_2\text{-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH}$
3. $\text{NH}_2\text{-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH}$
4. $\text{NH}_2\text{-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH}$

erreicht, die, an geeignete Carrierproteine gekoppelt, als Antigene im Tier eine spezifische Antikörperantwort induzieren. Diese Antikörper bilden die Grundlage für die Herstellung von Testsystemen für den spezifischen Nachweis von humaner Elastase 1.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen humane Elastase 1 und deren Nutzung in Nachweissystemen. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Entzündungen der Bauchspeicheldrüse stellen ein beträchtliches Gesundheitsrisiko für den Patienten dar. Während akut verlaufende Entzündungen auf Grund der schweren Symptomatik mit invasiven und nichtinvasiven diagnostischen Methoden rasch erkannt werden können, ist bei chronischen Verlaufsformen die Diagnose durch fehlende Möglichkeiten einer morphologischen und histologischen Verifizierung erschwert. Sie basiert neben der Bewertung klinischer Symptome auf funktionellen Parametern wie Verdauungsstörungen, Gewichtsverlust und Diabetes mellitus. Bei klinischem Verdacht auf Vorliegen einer chronischen Pankreasentzündung ist der Nachweis einer verminderten Leistungsfähigkeit (exokrine Pankreasinsuffizienz) für die differenzialdiagnostische Absicherung wichtig.

In den letzten Jahren hat sich der Nachweis von Elastase 1 im Stuhl als wichtiger Parameter für den indirekten Pankreasfunktionstest durchgesetzt. Die Elastase 1 ist ein proteolytisches pankreasspezifisches Enzym, das in großen Mengen in das Duodenum ausgeschieden wird und dort eine wichtige Verdauungsfunktion ausübt. Elastase 1 wird während der Darmpassage offensichtlich nicht abgebaut. Es kann unter Verwendung spezifischer Antikörper leicht immunchemisch mittels Enzymimmunassay (ELISA) oder Radioimmunassay (RIA) im Stuhl nachgewiesen werden. Die Enzymkonzentration im Stuhl zeigt somit den Funktionsgrad des exokrinen Pankreas an. Chronische Pankreasentzündungen, die mit einer exokrinen Insuffizienz einher gehen, können durch eine stark reduzierte Elastase 1 - Konzentration im Stuhl erkannt werden, während eine akute Pankreasentzündung durch den raschen Zerfall funktionellen Gewebes zu einem Anstieg von Elastase 1 im Plasma führt.

Für die Bestimmung von Elastase 1 stehen ein RIA (MURATA, A. et al., Enzyme 30, 29-37; 19983) und ein ELISA (EP 0 547 059 B1) zur Verfügung. Beide Teste haben sich in der Diagnostik bewährt. Der RIA hat jedoch in der Herstellung und Handhabung alle Nachteile von Systemen, die mit offener Radioaktivität arbeiten (Halbwertszeit, spezielle Laboratorien, besonders ausgebildetes Personal, aufwendige Entsorgung). Der ELISA ist gegen Epitope gerichtet, die Elastase-spezifisch sind, aber im funktionellen Enzym nicht oder nicht mehr vorkommen. Dadurch werden bei der Bestimmung der Elastase-Konzentration in solchen Fällen (wenn ein Anteil an funktionellem Enzym vorhanden ist) ungenaue Werte erhalten.

Die Erfindung hat daher zum Ziel, ein Testverfahren bereitzustellen, mit dessen Hilfe funktionelle Elastase 1 in Stuhl, Serum oder Plasma als Parameter für Entzündungen der Pankreas nachgewiesen werden kann.

Dieses Ziel wird erfindungsgemäß mittels Antikörpern erreicht, die gegen Epitope des reifen Enzyms gerichtet sind. Dazu wurde die DNA-Sequenz für humane Elastase 1 (JP 1987000276-A/6) in die Aminosäuresequenz übertragen. Unter Verwendung üblicher Proteinstrukturprogramme konnten mehrere Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die eine potentielle Epitopstruktur aufweisen. Es konnte nachgewiesen werden, daß Antikörper gegen die Peptide A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q hochspezifisch Elastase 1 binden und keine unspezifische Reaktion mit anderen Stuhlbestandteilen eingehen.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von anti-Elastase-Antikörpern auf übliche Weise, das jedoch dadurch gekennzeichnet ist, daß die verwendeten spezifischen Antigene zuvor mittels strukturanalytischer Methoden aus der Aminosäuresequenz abgeleitet und chemisch synthetisiert wurden. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, Teile dieser synthetischen Peptide für die Herstellung von Antikörpern zu verwenden. Wenngleich die Peptide allein eine Antikörperinduktion auslösen, hat es sich erfindungsgemäß als zweckmäßig erwiesen, diese Peptide an übliche Carriersubstanzen wie Hämocyanin zu

binden. Mit den erfindungsgemäßen Peptiden ist es möglich, sowohl monoklonale wie polyklonale Antikörper zu erzeugen.

Für die Herstellung der erfindungsgemäßen polyklonalen Antipeptidantikörper werden Versuchstiere wie Kaninchen, Meerschweinchen, Ziegen, Hühner oder Fische in bekannter Weise mit den Peptiden immunisiert. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper werden die Peptide in bekannter Weise für die Induktion spezifischer B-Zellen verwendet, die nach Fusionierung mit Myelomzellen Hybridomzellen generieren, die nach bekannten Klonierungsverfahren in Zelllinien kultiviert werden, die spezifische monoklonale Antikörper sezernieren. Die erfindungsgemäßen mono- oder polyklonalen Antikörper reagieren nur mit dem verwendeten spezifischen Epitop bzw. der reifen Elastase 1.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Elastase 1-epitopspezifischen Antikörper für den Nachweis und die Quantifizierung von Elastase 1 in Körperflüssigkeiten und Stuhl. Die Erfindung betrifft daher auch ein immunchemisches Nachweissystem zur Feststellung der Funktionalität des Pankreas als Hilfsmittel zur Erkennung von Funktionsstörungen dieses Organs. Dazu können die spezifischen Antikörper an jeden geeigneten Träger adsorptiv oder chemisch mit bekannten Kopplungsverfahren gebunden werden. Als Träger eignen sich Membranen oder Partikel. Mit einem erfindungsgemäßen Sandwich-ELISA unter Verwendung von je zwei unterschiedlichen Epitopantikörpern läßt sich schnell und spezifisch Elastase 1 in Stuhl und Serum bzw. Plasma nachweisen und quantifizieren.

08.09.88

7

B

Ausführungsbeispiele 1 - Herstellung spezifischer anti-Peptid-Antikörper, die gegen definierte Abschnitte der reifen humanen Elastase 1 gerichtet sind.

Mittels Festphasensynthese nach Merrifield werden die Peptide mit den Aminosäuresequenzen $\text{NH}_2\text{-A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N-COOH}$ und $\text{NH}_2\text{-G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q-COOH}$ synthetisiert. Die Peptide werden mit bekannten Verfahren an Napfschneckenhäemocyanin (KLH) gekoppelt (1 mg Peptid/mg KLH). Je 300 μg dieses Konjugates werden unter Zusatz von Freundschens Adjuvants für die Immunisierung von Kaninchen bzw. Huhn verwendet. Nach 3maliger Vakzination werden die Tiere entblutet. Nach Gewinnung des Serums wird die Spezifität der Antiseren in einem ELISA getestet. Dazu wird freies Peptid an die Oberfläche der Kavitäten von Mikrotiterplatten adsorbiert. Nach Inkubation der Kavitäten mit den Antiseren werden diese gründlich gewaschen. Unter Verwendung von Antikaninchen- bzw. Antihuhn-POD-Konjugat und TMB als Substrat werden in üblicher Weise die Antigen-Antikörperreaktion detektiert. Jedes Antiserum reagiert nur mit dem homologen Peptid.

Ausführungsbeispiel 2 - Nachweis der Spezifität der erfindungsgemäßen Antikörper

Die Elastase 1 - Spezifität kann im Westernblot nachgewiesen werden. Dazu werden grob- bzw. hochgereinigte Elastase 1 aus Stuhl mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese entsprechend ihrer relativen Molmasse von begleitenden Verunreinigungen getrennt. Die Proteinzonen aus dem Gel werden mit Hilfe einer «Semidry-blotting»-Apparatur auf Nitrozellulose übertragen. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran mit resuspendierter Trockenmagermilch werden die Membranen mit den 1 : 500 verdünnten anti-Peptid-Antiseren inkubiert. Nach intensiven Waschen der Membranen zur Entfernung aller unspezifisch gebundenen Antikörper werden die Membranen mit

Phosphatase - markierten anti-Kaninchen-Antikörpern inkubiert. Die spezifisch gebundenen sekundären Antikörper, die nach Waschen auf der Membran verblieben, werden nach Zugabe des Substrates sichtbar gemacht. Dabei zeigt sich, daß in den verwendeten Proben ausschließlich Elastase nachgewiesen wurde.

Ausführungsbeispiel 3 - Bestimmung der Elastase 1 in Stuhl unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper in einem ELISA

Die Elastase 1 in Serumproben oder in Stuhlproben wird in einem Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert, bestimmt. Ein polyklonaler Antikörper, der gegen Epitope der Elastase 1 gerichtet ist, wird in einem Karbonat/Bikarbonat-Puffergemisch, pH 9,6 gelöst und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach der Inkubation bei 4 °C über 12 h werden die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Die noch freien Bindungsstellen des Trägermaterials werden durch einen PBS-Puffer, der Ethanol-amin und Tween 20 enthält, geblockt. Das Blocken findet bei Raumtemperatur über 90 min statt. Nach dem Waschen werden die in PBS verdünnten Serum- bzw. Stuhlproben in die Wells pipettiert. Die 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur wird durch Waschen beendet. Ein zweiter Elastase 1 spezifischer polyklonaler Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist, wird zu der an den ersten Antikörper gebundenen Elastase gegeben.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten und dem Waschprozeß wird der biotinmarkierte Antikörper mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Durch den letzten Waschschrift erfolgt die Beseitigung des nicht gebundenen Streptavidins. Anschließend wird TMB als Substrat für die Peroxidase dazugegeben und nach einer definierten Zeit wird die Farbreaktion durch Zugabe von HCl abgestoppt. Gemessen wird die Änderung der optischen Dichte. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional der Elastase 1-Konzentration der Probe.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von mono- und/oder polyklonalen Antikörpern, die spezifisch mit humaner Elastase 1 in Stuhl oder Körperflüssigkeiten reagieren und durch übliche Immunisierungsverfahren dadurch gekennzeichnet, daß man die Peptide

A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N, Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R, R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N und G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q oder immunogene Teilpeptide davon als Antigen zur Immunisierung von Vertebraten, insbesondere von Kleinsäugetieren und Vögeln, verwendet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die freien Peptide vor der Immunisierung an geeignete Trägersubstanzen, vorzugsweise Hämocyanin oder Albumin koppelt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß polyklonale Antikörper unter Einsatz von Hühnern als Versuchstieren produziert werden.

4. Polyklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 1 und ggf. 2 und 3 hergestellt wurden.

5. Monoklonale Antikörper, sofern sie nach Anspruch 1 und ggf. 2 hergestellt wurden.

6. Peptid A-V-K-E-G-P-E-Q-V-I-P-I-N

7. Peptid Y-T-N-G-P-L-P-D-K-L-Q-Q-A-R

8. Peptid R-S-G-C-N-G-D-S-G-G-P-L-N

9. Peptid G-P-L-N-C-P-T-E-D-G-G-W-Q

08.09.98

10

10. Reinigungs- und Detektionssysteme für humane Elastase 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen der erfindungsgemäßen Antikörper enthalten.

11. Immunologische Testkits nach Anspruch 10 zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse und der Mucoviscidose unter Verwendung von Stuhl oder Körperflüssigkeiten.

12. Immunologische Testkits nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß 2 unterschiedliche Antikörper verwendet werden (Sandwich-ELISA).

THIS PAGE BLANK (USPTO)